

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 5 日
Date of Application:

Toshihide EZOE, et al.
BIOSENSOR
Mark Boland
February 18, 2004
3 of 6

Q79759

202-293-7060

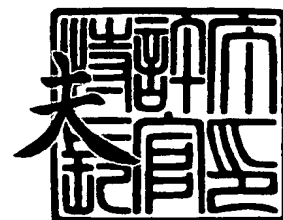
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 5 8 7 3 5
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 5 8 7 3 5]

出 願 人 富士写真フイルム株式会社
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 月 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 1 0 8 5 4 0

【書類名】 特許願

【整理番号】 A31103A

【提出日】 平成15年 3月 5日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/543

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 久保 利昭

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 江副 利秀

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 山之内 淳一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地 富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 塚田 芳久

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】

【識別番号】 110000109

【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

【代表者】 今村 正純

**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 170347**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 要約書 1**【包括委任状番号】** 0205141**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 バイオセンサー

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 疎水性高分子化合物でコーティングした基板から成るバイオセンサーであって、生理活性物質をバイオセンサーの表面に固定化するためのリンカーを有している上記バイオセンサー。

【請求項 2】 リンカーが、生理活性物質をバイオセンサーの表面に化学結合によって固定化するためのリンカーである、請求項 1 に記載のバイオセンサー。

【請求項 3】 リンカーが、生理活性物質をバイオセンサーの表面に共有結合によって固定化するためのリンカーである、請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサー。

【請求項 4】 リンカーが一般式 (1) で表される化合物である、請求項 1 から 3 の何れかに記載のバイオセンサー。

一般式 (1) : $X-L-Y$

(式中、X は疎水性高分子化合物の官能基と反応しうる基を示し、L は 2 価の連結基を示し、Y は生理活性物質を固定化できる基を示す。)

【請求項 5】 一般式 (1) の L の総原子数が 2 ~ 1000 である、請求項 4 に記載のバイオセンサー。

【請求項 6】 基板が金属表面あるいは金属膜である、請求項 1 から 5 の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 7】 金属表面あるいは金属膜が、金、銀、銅、白金又はアルミニウムからなる群より選ばれる自由電子金属からなるものである、請求項 6 に記載のバイオセンサー。

【請求項 8】 非電気化学的検出に使用される、請求項 1 から 7 の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 9】 表面プラズモン共鳴分析に使用される、請求項 1 から 8 の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 10】 疎水性高分子化合物でコーティングした基板にリンカーを

反応させる工程を含む、請求項 1 から 9 の何れかに記載のバイオセンサーの製造方法。

【請求項 1 1】 生理活性物質がリンカーを介して表面に結合している、請求項 1 から 9 の何れかに記載のバイオセンサー。

【請求項 1 2】 請求項 1 から 9 の何れかに記載のバイオセンサーと生理活性物質とを接触させて、該バイオセンサーの表面に該生理活性物質をリンカーを介して結合させる工程を含む、バイオセンサーに生理活性物質を固定化する方法。

【請求項 1 3】 生理活性物質がリンカーを介して表面に結合している請求項 1 から 9 の何れかに記載のバイオセンサーと被験物質とを接触させる工程を含む、該生理活性物質と相互作用する物質を検出または測定する方法。

【請求項 1 4】 生理活性物質と相互作用する物質を非電気化学的方法により検出または測定する、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】 生理活性物質と相互作用する物質を表面プラズモン共鳴分析により検出または測定する、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、バイオセンサー及びそれを用いた生体分子間の相互作用を分析する方法に関する。特に本発明は、表面プラズモン共鳴バイオセンサーに用いるためのバイオセンサー及びそれを用いた生体分子間の相互作用を分析する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

現在、臨床検査等で免疫反応など分子間相互作用を利用した測定が数多く行われているが、従来法では煩雑な操作や標識物質を必要とするため、標識物質を必要とすることなく、測定物質の結合量変化を高感度に検出することのできるいくつかの技術が使用されている。例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）測定技術、水晶発振子マイクロバランス（QCM）測定技術、金のコロイド粒子から超微

粒子までの機能化表面を使用した測定技術である。SPR測定技術はチップの金属膜に接する有機機能膜近傍の屈折率変化を反射光波長のピークシフト又は一定波長における反射光量の変化を測定して求めることにより、表面近傍に起こる吸着及び脱着を検知する方法である。QCM測定技術は水晶発振子の金電極（デバイス）上の物質の吸脱着による発振子の振動数変化から、ngレベルで吸脱着質量を検出できる技術である。また、金の超微粒子（nmレベル）表面を機能化させて、その上に生理活性物質を固定して、生理活性物質間の特異認識反応を行わせることによって、金微粒子の沈降、配列から生体関連物質の検出ができる。

【0003】

上記した技術においては、いずれの場合も、生理活性物質を固定化する表面が重要である。以下、当技術分野で最も使われている表面プラズモン共鳴（SPR）を例として、説明する。

【0004】

一般に使用される測定チップは、透明基板（例えば、ガラス）、蒸着された金属膜、及びその上に生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜からなり、その官能基を介し、金属表面に生理活性物質を固定化する。該生理活性物質と検体物質間の特異的な結合反応を測定することによって、生体分子間の相互作用を分析する。

【0005】

生理活性物質を固定化できる官能基を有する薄膜としては、金属と結合する官能基、鎖長の原子数が10以上のリンカー、及び生理活性物質と結合できる官能基を有する化合物を用いて、生理活性物質を固定化した測定チップが報告されている（特許文献1を参照）。また、金属膜と、該金属膜の上に形成されたプラズマ重合膜からなる測定チップが報告されている（特許文献2を参照）。

【0006】

一方、生理活性物質と検体物質間の特異的な結合反応を測定する場合、検体物質は必ずしも単一成分ではなく、例えば細胞抽出液中などのような不均一系で検体物質を測定することも要求される。その場合、種々の蛋白質、脂質などの夾雑物が検出表面に非特異的な吸着を起こすと、測定検出感度が著しく低下する。上

記の検出表面では、非特異吸着が極めて起こりやすく問題があった。

【0007】

この問題を解決するためにいくつかの方法が検討されている。例えば、金属表面にリンカーを介し、親水性のハイドロゲルを固定化することで、物理吸着を抑制する方法も使用されてきた（特許文献1、特許文献3及び特許文献4を参照）。しかしながら、この方法でも非特異吸着の抑制性は十分なレベルではなかった。

【0008】

【特許文献1】

特許第2815120号

【特許文献2】

特開平9-264843号

【特許文献3】

米国特許第5436161号

【特許文献4】

特開平8-193948号公報

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記した従来技術の問題を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、非特異吸着を抑制したバイオセンサー用検出表面を提供することを解決すべき課題とした。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、基板の表面を疎水性高分子化合物でコーティングしたバイオセンサーに生理活性物質をバイオセンサーの表面に固定化するためのリンカーを結合させることによって、非特異吸着を抑制したバイオセンサーを提供できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

即ち、本発明によれば、疎水性高分子化合物でコーティングした基板から成るバイオセンサーであって、生理活性物質をバイオセンサーの表面に固定化するためのリンカーを有している上記バイオセンサーが提供される。

【0012】

好ましくは、リンカーは、生理活性物質をバイオセンサーの表面に化学結合によって固定化するためのリンカーである。

さらに好ましくは、リンカーは、生理活性物質をバイオセンサーの表面に共有結合によって固定化するためのリンカーである。

好ましくは、リンカーは一般式(1)で表される化合物である。

一般式(1)： $X-L-Y$

(式中、Xは疎水性高分子化合物の官能基と反応しうる基を示し、Lは2価の連結基を示し、Yは生理活性物質を固定化できる基を示す。)

好ましくは、一般式(1)のLの総原子数は2～1000である。

【0013】

好ましくは、基板は金属表面あるいは金属膜である。

好ましくは、金属表面あるいは金属膜は、金、銀、銅、白金又はアルミニウムからなる群より選ばれる自由電子金属からなる。

好ましくは、本発明のバイオセンサーは非電気化学的検出に使用することができ、さらに好ましくは表面プラズモン共鳴分析に使用することができる。

【0014】

本発明の別の側面によれば、疎水性高分子化合物でコーティングした基板にリンカーを反応させる工程を含む、上記バイオセンサーの製造方法が提供される。

【0015】

本発明のさらに別の側面によれば、生理活性物質がリンカーを介して表面に結合している、上記バイオセンサーが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記バイオセンサーと生理活性物質とを接触させて、該バイオセンサーの表面に該生理活性物質をリンカーを介して結合させる工程を含む、バイオセンサーに生理活性物質を固定化する方法が提供される。

。

【0016】

本発明のさらに別の側面によれば、生理活性物質がリンカーを介して表面に結合している上記バイオセンサーと被験物質とを接触させる工程を含む、該生理活性物質と相互作用する物質を検出または測定する方法が提供される。

好ましくは、生理活性物質と相互作用する物質を非電気化学的方法により検出または測定することができ、さらに好ましくは、生理活性物質と相互作用する物質を表面プラズモン共鳴分析により検出または測定する。

【0017】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明のバイオセンサーは、疎水性高分子化合物でコーティングした基板から成り、生理活性物質をバイオセンサーの表面に固定化するためのリンカーを有していることを特徴とする。

【0018】

本発明で使用するリンカーについて説明する。

本発明のリンカーは、生理活性物質と疎水性高分子化合物を間接的に固定化できるものを言う。固定化する方法としては、静電的相互作用を用いる方法、疎水性相互作用を用いる方法、化学結合を用いる方法などが挙げられるが、化学結合を用いる方法が好ましく用いられる。化学結合には、共有結合、イオン結合、配位結合、水素結合などがあるが、共有結合が最も好ましく用いられる。

【0019】

本発明で使用するリンカーの具体例としては下記一般式（1）で表される化合物が挙げられる。

一般式（1）： $X-L-Y$

（式中、Xは疎水性高分子化合物の官能基と反応しうる基を示し、Lは2価の連結基を示し、Yは生理活性物質を固定化できる基を示す。）

【0020】

一般式（1）において、Xは疎水性高分子化合物の官能基と反応しうる基を表し、好ましくは、ハロゲン原子、アミノ基、もしくは保護基により保護されたア

ミノ基、カルボキシル基、もしくは脱離基を有するカルボニル基、水酸基、保護基により保護された水酸基、アルデヒド基、 $-NHNH_2$ 、 $-N=C=O$ 、 $-N=C=S$ 、エポキシ基、又はビニル基である。

ここでいう保護基とは、反応系内で脱保護して官能基を形成させる事のできる基であり、例えばアミノ基の保護基としては、tertブチルオキシカルボニル基 (Boc)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基 (Fmoc)、ニトロフェニルスルフェニル基 (Nps)、ジチアスクシニル基 (Dts) 等が挙げられる。

【0021】

また、水酸基の保護基としては、アシル基等が挙げられる。

ここでいう脱離基は、ハロゲン原子、アルコキシ基、アリアルオキシ基、アルキルカルボニルオキシ基、アリアルカルボニルオキシ基、ハロゲン化アルキルカルボニルオキシ基、アルキルスルホニルオキシ基、ハロゲン化アルキルスルホニルオキシ基、アリアルスルホニルオキシ基等を挙げることができる。

また、脱離基としては、カルボン酸と既知の脱水縮合試薬（例えばカルボジイミド類）とN-ヒドロキシ化合物を組み合わせ生成されるエステル基も好ましく用いられる。

【0022】

一般式(1)において、Lは2価の連結基を表し、Lの総原子数は、2～1000であることが好ましい。さらに、置換もしくは無置換のアルキル基、置換もしくは無置換のアルキレンオキシ基、置換もしくは無置換のアリーレンオキシ基、もしくは一般式(1)のXと別の分子のYが結合し、構成が連続する2価の連結基であることが好ましい。

【0023】

一般式(1)において、Yは生理活性物質を固定化できる基を表し、好ましくは、ハロゲン原子、アミノ基、もしくは保護基により保護されたアミノ基、カルボキシル基、もしくは脱離基を有するカルボニル基、水酸基、保護基により保護された水酸基、アルデヒド基、 $-NHNH_2$ 、 $-N=C=O$ 、 $-N=C=S$ 、エポキシ基、又はビニル基である。

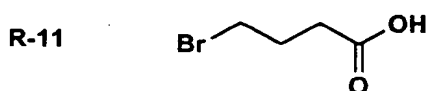
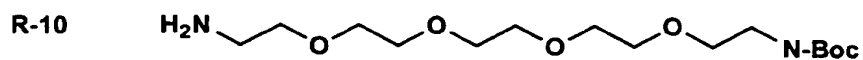
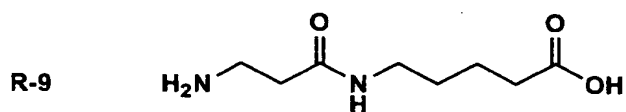
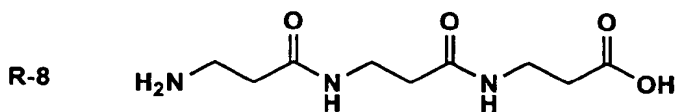
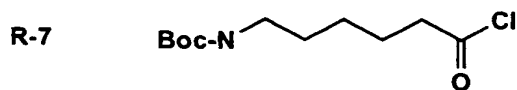
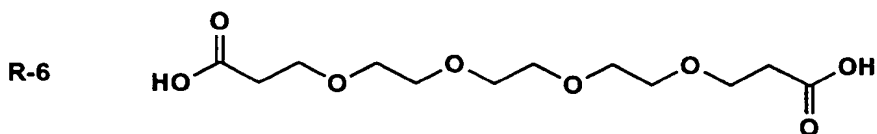
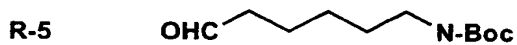
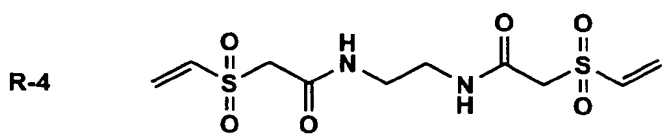
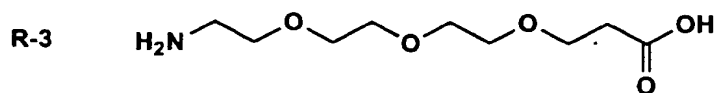
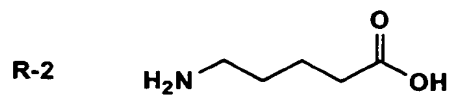
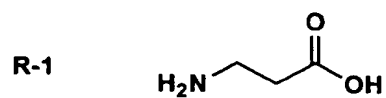
保護基、脱離基は、前述のものと同様なものを用いることができる。

【0024】

以下に一般式（1）の化合物の具体例を示すが、本発明で利用できる一般式（1）の化合物はこれらに限定されるものではない。

【0025】

【化1】



【0026】

本発明で言うバイオセンサーとは最も広義に解釈され、生体分子間の相互作用を電氣的信号等の信号に変換して、対象となる物質を測定・検出するセンサーを意味する。通常のバイオセンサーは、検出対象とする化学物質を認識するレセプター部位と、そこに発生する物理的变化又は化学的变化を電気信号に変換するトランスデューサー部位とから構成される。生体内には、互いに親和性のある物質として、酵素／基質、酵素／補酵素、抗原／抗体、ホルモン／レセプターなどがある。バイオセンサーでは、これら互いに親和性のある物質の一方を基板に固定化して分子認識物質として用いることによって、対応させるもう一方の物質を選択的に計測するという原理を利用している。

【0027】

本発明で用い疎水性高分子化合物は、吸水性を有しない高分子化合物であり、水への溶解度（25℃）が10%以下、より好ましくは1%以下、最も好ましくは0.1%以下である。

【0028】

疎水性高分子化合物を形成する疎水性単量体としては、ビニルエステル類、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、オレフィン類、スチレン類、クロトン酸エステル類、イタコン酸ジエステル類、マレイン酸ジエステル類、フマル酸ジエステル類、アリル化合物類、ビニルエーテル類、ビニルケトン類等から任意に選ぶことができる。疎水性高分子化合物としては、1種類のモノマーから成るホモポリマーでも、2種類以上のモノマーから成るコポリマーでもよい。

【0029】

本発明で好ましく用いられる疎水性高分子化合物としては、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリビニルクロライド、ポリメチルメタクリレート、ポリエステル、ナイロンなどが挙げられる。

【0030】

疎水性高分子化合物の基板へのコーティングは常法によって行うことができ、例えば、スピン塗布、エアナイフ塗布、バー塗布、ブレード塗布、スライド塗布、カーテン塗布、さらにはスプレー法、蒸着法、キャスト法、浸漬法等によって

行うことができる。

【0031】

疎水性高分子化合物のコーティング厚さは特に限定されないが、好ましくは10000オングストローム以上50000オングストローム以下であり、特に好ましくは10000オングストローム以上30000オングストローム以下である。

【0032】

本発明のバイオセンサーは、金属表面又は金属膜を疎水性高分子化合物でコーティングしたものであることが好ましい。金属表面あるいは金属膜を構成する金属としては、例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、表面プラズモン共鳴が生じ得るようなものであれば特に限定されない。好ましくは金、銀、銅、アルミニウム、白金等の自由電子金属が挙げられ、特に金が好ましい。それらの金属は単独又は組み合わせて使用することができる。また、上記基板への付着性を考慮して、基板と金属からなる層との間にクロム等からなる介在層を設けてもよい。

【0033】

金属膜の膜厚は任意であるが、例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、10000オングストローム以上50000オングストローム以下であるのが好ましく、特に10000オングストローム以上20000オングストローム以下であるのが好ましい。50000オングストロームを超えると、媒質の表面プラズモン現象を十分検出することができない。また、クロム等からなる介在層を設ける場合、その介在層の厚さは、10000オングストローム以上、100000オングストローム以下であるのが好ましい。

【0034】

金属膜の形成は常法によって行えばよく、例えば、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、電気めっき法、無電解めっき法等によって行うことができる。

【0035】

金属膜は好ましくは基板上に配置されている。ここで、「基板上に配置される」とは、金属膜が基板上に直接接触するように配置されている場合のほか、金属

膜が基板に直接接触することなく、他の層を介して配置されている場合をも含む意味である。本発明で 사용할 ことができる基板としては例えば、表面プラズモン共鳴バイオセンサー用を考えた場合、一般的にはBK7等の光学ガラス、あるいは合成樹脂、具体的にはポリメチルメタクリレート、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、シクロオレフィンポリマーなどのレーザー光に対して透明な材料からなるものが使用できる。このような基板は、好ましくは、偏光に対して異方性を示さずかつ加工性の優れた材料が望ましい。

【0036】

本発明のバイオセンサーは、疎水性高分子化合物でコーティングした基板にリンカーを反応させる工程によって製造することができる。これにより製造されたバイオセンサーは、基板の最表面にリンカーを有し、そのリンカーは生理活性物質を固定化できる基を有していることが好ましい。ここで言う「基板の最表面」とは、「基板から最も遠い側」という意味であり、さらに具体的には、「基板上にコーティングした疎水性高分子化合物中の基板から最も遠い側」という意味である。

【0037】

上記のようにして得られたバイオセンサー用表面に上記の生理活性物質を固定化できる基を介して生理活性物質を固定化させることによって、金属表面又は金属膜に生理活性物質を固定化することができる。

【0038】

本発明のバイオセンサー用表面上に固定される生理活性物質としては、測定対象物と相互作用するものであれば特に限定されず、例えば免疫蛋白質、酵素、微生物、核酸、低分子有機化合物、非免疫蛋白質、免疫グロブリン結合性蛋白質、糖結合性蛋白質、糖を認識する糖鎖、脂肪酸もしくは脂肪酸エステル、あるいはリガンド結合能を有するポリペプチドもしくはオリゴペプチドなどが挙げられる。

【0039】

免疫蛋白質としては、測定対象物を抗原とする抗体やハプテンなどを例示することができる。抗体としては、種々の免疫グロブリン、即ちIgG、IgM、I

g A、I g E、I g Dを使用することができる。具体的には、測定対象物がヒト血清アルブミンであれば、抗体として抗ヒト血清アルブミン抗体を使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を抗原とする場合には、例えば抗アトラジン抗体、抗カナマイシン抗体、抗メタンフェタミン抗体、あるいは病原性大腸菌の中でO抗原26、86、55、111、157 などに対する抗体等を使用することができる。

【0040】

酵素としては、測定対象物又は測定対象物から代謝される物質に対して活性を示すものであれば、特に限定されることなく、種々の酵素、例えば酸化還元酵素、加水分解酵素、異性化酵素、脱離酵素、合成酵素等を使用することができる。具体的には、測定対象物がグルコースであれば、グルコースオキシダーゼを、測定対象物がコレステロールであれば、コレステロールオキシダーゼを使用することができる。また、農薬、殺虫剤、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、抗生物質、麻薬、コカイン、ヘロイン、クラック等を測定対象物とする場合には、それらから代謝される物質と特異的反応を示す、例えばアセチルコリンエステラーゼ、カテコールアミンエステラーゼ、ノルアドレナリンエステラーゼ、ドーパミンエステラーゼ等の酵素を使用することができる。

【0041】

微生物としては、特に限定されることなく、大腸菌をはじめとする種々の微生物を使用することができる。

核酸としては、測定の対象とする核酸と相補的にハイブリダイズするものを使用することができる。核酸は、DNA（cDNAを含む）、RNAのいずれも使用できる。DNAの種類は特に限定されず、天然由来のDNA、遺伝子組換え技術により調製した組換えDNA、又は化学合成DNAの何れでもよい。

低分子有機化合物としては通常の有機化学合成の方法で合成することができる任意の化合物が挙げられる。

【0042】

非免疫蛋白質としては、特に限定されることなく、例えばアビジン（ストレプト

トアビジン)、ビオチン又はレセプターなどを使用できる。

免疫グロブリン結合性蛋白質としては、例えばプロテインAあるいはプロテインG、リウマチ因子(RF)等を使用することができる。

糖結合性蛋白質としては、レクチン等が挙げられる。

脂肪酸あるいは脂肪酸エステルとしては、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、ステアリン酸エチル、アラキジン酸エチル、ベヘン酸エチル等が挙げられる。

【0043】

生理活性物質が抗体や酵素などの蛋白質又は核酸である場合、その固定化は、生理活性物質のアミノ基、チオール基等を利用し、金属表面の官能基に共有結合させることで行うことができる。

【0044】

上記のようにして生理活性物質を固定化したバイオセンサーは、当該生理活性物質と相互作用する物質の検出及び／又は測定のために使用することができる。

【0045】

即ち、本発明によれば、生理活性物質が固定化された本発明のバイオセンサーを用いて、これに被験物質を接触させることにより、該バイオセンサーに固定化されている生理活性物質と相互作用する物質を検出及び／又は測定する方法が提供される。

被験物質としては例えば、上記した生理活性物質と相互作用する物質を含む試料などを使用することができる。

【0046】

本発明では、バイオセンサー用表面に固定化されている生理活性物質と被験物質との相互作用を非電気化学的方法により検出及び／又は測定することが好ましい。非電気化学的方法としては、表面プラズモン共鳴(SPR)測定技術、水晶発振子マイクロバランス(QCM)測定技術、金のコロイド粒子から超微粒子までの機能化表面を使用した測定技術などが挙げられる。

【0047】

本発明の好ましい態様によれば、本発明のバイオセンサーは、例えば、透明基

板上に配置される金属膜を備えていることを特徴とする表面プラズモン共鳴用バイオセンサーとして用いることができる。

【0048】

表面プラズモン共鳴用バイオセンサーとは、表面プラズモン共鳴バイオセンサーに使用されるバイオセンサーであって、該センサーより照射された光を透過及び反射する部分、並びに生理活性物質を固定する部分とを含む部材を言い、該センサーの本体に固着されるものであってもよく、また脱着可能なものであってもよい。

【0049】

表面プラズモン共鳴の現象は、ガラス等の光学的に透明な物質と金属薄膜層との境界から反射された単色光の強度が、金属の出射側にある試料の屈折率に依存することによるものであり、従って、反射された単色光の強度を測定することにより、試料を分析することができる。

【0050】

表面プラズモンが光波によって励起される現象を利用して、被測定物質の特性を分析する表面プラズモン測定装置としては、Kretschmann配置と称される系を用いるものが挙げられる（例えば特開平6-167443号公報参照）。上記の系を用いる表面プラズモン測定装置は基本的に、例えばプリズム状に形成された誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成されて試料液などの被測定物質に接触させられる金属膜と、光ビームを発生させる光源と、上記光ビームを誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射条件が得られるように種々の角度で入射させる光学系と、上記界面で全反射した光ビームの強度を測定して表面プラズモン共鳴の状態、つまり全反射減衰の状態を検出する光検出手段とを備えてなるものである。

【0051】

なお上述のように種々の入射角を得るためには、比較的細い光ビームを入射角を変化させて上記界面に入射させてもよいし、あるいは光ビームに種々の角度で入射する成分が含まれるように、比較的太い光ビームを上記界面に収束光状態であるいは発散光状態で入射させてもよい。前者の場合は、入射した光ビームの入

射角の変化に従って、反射角が変化する光ビームを、上記反射角の変化に同期して移動する小さな光検出器によって検出したり、反射角の変化方向に沿って延びるエリアセンサによって検出することができる。一方後者の場合は、種々の反射角で反射した各光ビームを全て受光できる方向に延びるエリアセンサによって検出することができる。

【0052】

上記構成の表面プラズモン測定装置において、光ビームを金属膜に対して全反射角以上の特定入射角で入射させると、該金属膜に接している被測定物質中に電界分布をもつエバネッセント波が生じ、このエバネッセント波によって金属膜と被測定物質との界面に表面プラズモンが励起される。エバネッセント光の波数ベクトルが表面プラズモンの波数と等しくて波数整合が成立しているとき、両者は共鳴状態となり、光のエネルギーが表面プラズモンに移行するので、誘電体ブロックと金属膜との界面で全反射した光の強度が鋭く低下する。この光強度の低下は、一般に上記光検出手段により暗線として検出される。なお上記の共鳴は、入射ビームがp偏光のときにだけ生じる。したがって、光ビームがp偏光で入射するように予め設定しておく必要がある。

【0053】

この全反射減衰 (ATR) が生じる入射角、すなわち全反射減衰角 (θ_{SP}) より表面プラズモンの波数が分かると、被測定物質の誘電率が求められる。この種の表面プラズモン測定装置においては、全反射減衰角 (θ_{SP}) を精度良く、しかも大きなダイナミックレンジで測定することを目的として、特開平11-326194号公報に示されるように、アレイ状の光検出手段を用いることが考えられている。この光検出手段は、複数の受光素子が所定方向に配設されてなり、前記界面において種々の反射角で全反射した光ビームの成分をそれぞれ異なる受光素子が受光する向きにして配設されたものである。

【0054】

そしてその場合は、上記アレイ状の光検出手段の各受光素子が出力する光検出信号を、該受光素子の配設方向に関して微分する微分手段が設けられ、この微分手段が出力する微分値に基づいて全反射減衰角 (θ_{SP}) を特定し、被測定物質

の屈折率に関連する特性を求めることが多い。

【0055】

また、全反射減衰 (ATR) を利用する類似の測定装置として、例えば「分光研究」第47巻 第1号 (1998) の第21～23頁および第26～27頁に記載がある漏洩モード測定装置も知られている。この漏洩モード測定装置は基本的に、例えばプリズム状に形成された誘電体ブロックと、この誘電体ブロックの一面に形成されたクラッド層と、このクラッド層の上に形成されて、試料液に接触させられる光導波層と、光ビームを発生させる光源と、上記光ビームを上記誘電体ブロックに対して、該誘電体ブロックとクラッド層との界面で全反射条件が得られるように種々の角度で入射させる光学系と、上記界面で全反射した光ビームの強度を測定して導波モードの励起状態、つまり全反射減衰状態を検出する光検出手段とを備えてなるものである。

【0056】

上記構成の漏洩モード測定装置において、光ビームを誘電体ブロックを通してクラッド層に対して全反射角以上の入射角で入射させると、このクラッド層を透過した後に光導波層においては、ある特定の波数を有する特定入射角の光のみが導波モードで伝搬するようになる。こうして導波モードが励起されると、入射光のほとんどが光導波層に取り込まれるので、上記界面で全反射する光の強度が鋭く低下する全反射減衰が生じる。そして導波光の波数は光導波層の上の被測定物質の屈折率に依存するので、全反射減衰が生じる上記特定入射角を知ることによって、被測定物質の屈折率や、それに関連する被測定物質の特性を分析することができる。

【0057】

なおこの漏洩モード測定装置においても、全反射減衰によって反射光に生じる暗線の位置を検出するために、前述したアレイ状の光検出手段を用いることができ、またそれと併せて前述の微分手段が適用されることも多い。

【0058】

また、上述した表面プラズモン測定装置や漏洩モード測定装置は、創薬研究分野等において、所望のセンシング物質に結合する特定物質を見いだすランダムス

クリーニングへ使用されることがあり、この場合には前記薄膜層（表面プラズモン測定装置の場合は金属膜であり、漏洩モード測定装置の場合はクラッド層および光導波層）上に上記被測定物質としてセンシング物質を固定し、該センシング物質上に種々の被検体が溶媒に溶かされた試料液を添加し、所定時間が経過する毎に前述の全反射減衰角（ θ_{SP} ）の角度を測定している。

【0059】

試料液中の被検体が、センシング物質と結合するものであれば、この結合によりセンシング物質の屈折率が時間経過に伴って変化する。したがって、所定時間経過毎に上記全反射減衰角（ θ_{SP} ）を測定し、該全反射減衰角（ θ_{SP} ）の角度に変化が生じているか否かを測定することにより、被検体とセンシング物質の結合状態を測定し、その結果に基づいて被検体がセンシング物質と結合する特定物質であるか否かを判定することができる。このような特定物質とセンシング物質との組み合わせとしては、例えば抗原と抗体、あるいは抗体と抗体が挙げられる。具体的には、ウサギ抗ヒト IgG 抗体をセンシング物質として薄膜層の表面に固定し、ヒト IgG 抗体を特定物質として用いることができる。

【0060】

なお、被検体とセンシング物質の結合状態を測定するためには、全反射減衰角（ θ_{SP} ）の角度そのものを必ずしも検出する必要はない。例えばセンシング物質に試料液を添加し、その後の全反射減衰角（ θ_{SP} ）の角度変化量を測定して、その角度変化量の大小に基づいて結合状態を測定することもできる。前述したアレイ状の光検出手段と微分手段を全反射減衰を利用した測定装置に適用する場合であれば、微分値の変化量は、全反射減衰角（ θ_{SP} ）の角度変化量を反映しているため、微分値の変化量に基づいて、センシング物質と被検体との結合状態を測定することができる（本出願人による特願 2000-398309 号参照）。このような全反射減衰を利用した測定方法および装置においては、底面に予め成された薄膜層上にセンシング物質が固定されたカップ状あるいはシャーレ状の測定チップに、溶媒と被検体からなる試料液を滴下供給して、上述した全反射減衰角（ θ_{SP} ）の角度変化量の測定を行っている。

【0061】

さらに、ターンテーブル等に搭載された複数個の測定チップの測定を順次行うことにより、多数の試料についての測定を短時間で行うことができる全反射減衰を利用した測定装置が、特開 2001-330560 号公報に記載されている。

【0062】

本発明のバイオセンサーを表面プラズモン共鳴分析に使用する場合、上記したような各種の表面プラズモン測定装置の一部として適用することができる。

以下の実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0063】

【実施例】

実施例 1：バイオセンサー用チップの作製

(1) ポリメチルメタクリレートでコーティングしたバイオセンサー用チップの作製

金膜の厚さが 500 オングストロームになるように金を蒸着した 1cm (1cm のカバーガラスを Model-208 UV-オゾンクリーニングシステム (TECHNOVISION INC.) で 30 分処理した後、スピコート機 (MODEL ASS-303、ABLE 製) にセットし 1000rpm にて回転させ、金蒸着カバーガラス中央にポリメチルメタクリレートのメチルエチルケトン溶液 (2mg/ml) を 50 μ l 滴下し、2 分後に回転を止めた。エリプソメトリー法 (In-Situ Ellipsometer MAUS-101、Five Lab 製) により膜厚を測定したところ、ポリメタクリル酸メチル膜の厚さは 200 オングストロームであった。このサンプルを PMMA 表面チップと呼ぶ。

【0064】

(2) PMMA 表面への COOH 基の導入

上記のように作成したポリメチルメタクリレートでコーティングしたカバーガラスを NaOH 水溶液 (1 N) に 40℃ 16 時間浸漬した後、水で 3 回洗浄した。このサンプルを PMMA/COOH 表面チップと呼ぶ。

【0065】

(3) 生理活性物質と固定化する表面の作成

上記のように作成した PMMA/COOH 表面チップを市販の表面プラズモン共鳴バイ

オセンサー（ビアコア社製、BIACORE3000）のカートリッジブロック上に設置し、1-エチル-2,3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド（400mM）とN-ヒドロキシスクシンイミド（100mM）との混合液300 μ Lを流速10 μ L/minで測定セルに流した。

その後、R-1溶液（1M、pH8.5）及びR-2溶液（1M、pH8.5）の各々300 μ Lを流速10 μ L/minで測定セルに流した。化合物R-1及びR-2の化学構造は本明細書の上記の化1に示した通りである。このサンプルをPMMA/R-1表面チップ及びPMMA/R-2表面チップと呼ぶ。

【0066】

比較例1：表面コーティングを行わない金表面チップの作製

金膜の厚さが500オングストロームになるように金を蒸着した1cm(1cmのカバーガラスをModel-208UV-オゾンクリーニングシステム（TECHNOVISION INC.）で30分処理した。このサンプルを金表面チップと呼ぶ。

【0067】

比較例2：SAM化合物（7-カルボキシ-1-ヘプタンチオール）で被覆処理したバイオセンサー用チップの作製（SAM：自己組織化膜）

金蒸着膜が50nmの1cm(1cmのカバーガラスをオゾンクリーナーで30分処理した後、1mMの7-カルボキシ-1-ヘプタンチオール（同仁化学）のエタノール溶液に浸して、25℃で18時間表面処理を行った。その後、40℃でエタノール5回、エタノール/水混合溶媒で1回、水で5回洗浄した。このサンプルをSAM表面チップと呼ぶ。

【0068】

実施例2：バイオセンサー用チップの性能評価：

（1）蛋白質の非特異吸着の測定

バイオセンサー表面に対する非特異的な蛋白質の吸着はノイズの原因となる為、極力少ないほうが好ましい。以下のサンプル1-1～1-5においてBSA（シグマ製）、アビジン（ナカライテスク製）の非特異吸着性を調べた。

【0069】

サンプル1-1：表面処理を行っていない金表面チップ（比較例1の方法で作製

)

サンプル 1-2: SAM表面チップ (比較例 2 の方法で作製) においてCOOH基をエタノールアミンでブロックしたチップ

サンプル 1-3: PMMA/COOH表面チップ (実施例 1 の (2) の方法で作製) においてCOOH基をエタノールアミンでブロックしたチップ

サンプル 1-4: PMMA/R-1表面チップ (実施例 1 の (3) の方法で作製) においてCOOH基をエタノールアミンでブロックしたチップ

サンプル 1-5: PMMA/R-2表面チップ (実施例 1 の (3) の方法で作製) においてCOOH基をエタノールアミンでブロックしたチップ

【0070】

上記サンプル 1-2 ~ サンプル 1-5 のCOOH基のエタノールアミンによるブロックは以下の方法で行った。各チップを市販の表面プラズモン共鳴バイオセンサー (ピアコア社製、BIAcore3000) のカートリッジブロック上に設置し、1-エチル-2, 3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド (400 mM) とN-ヒドロキシスクシンイミド (100 mM) との混合液 100 μ L を流速 10 μ L/min で測定セルに流した。その後、エタノールアミン・HCl 溶液 (1M、pH8.5) 100 μ L を流速 10 μ L/min で測定セルに流した。

【0071】

上記サンプル 1-1 ~ 1-5 を表面プラズモン共鳴バイオセンサー (ピアコア社製、BIAcore3000) のカートリッジブロック上に設置し、BSA 溶液 (1 mg/ml、HBS-EP バッファー (ピアコア社製、pH7.4)) あるいはアビジン 溶液 (1 mg/ml、HBS-EP バッファー) 50 μ L を流速 10 μ L/min で測定セルに流した。なお、HBS-EP バッファーの組成は、HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid) 0.01 mol/l (pH7.4)、NaCl 0.15 mol/l、EDTA 0.003 mol/l、Surfactant P20 0.005 重量% である。BSA 溶液あるいはアビジン 溶液の注入終了から 3 分後の共鳴シグナル (RU 値) 変化量を各蛋白質の非特異吸着量とした。

【0072】

(2) 蛋白質・検体化合物間の相互作用の測定

以下のサンプルにニュートラルアビジン (PIERCE製) を固定化し、D-ビオチン (ナカライテスク製) との相互作用測定を以下の方法で行った。

サンプル 2-1: SAM表面チップ (比較例 2 の方法で作製)

サンプル 2-2: PMMA/COOH表面チップ (実施例 1 の (2) の方法で作製)

サンプル 2-3: PMMA/R-1表面チップ (実施例 1 の (3) の方法で作製)

サンプル 2-4: PMMA/R-2表面チップ (実施例 1 の (3) の方法で作製)

【0073】

上記サンプル 2-1 ~ 2-4 の生理活性物質固定化用チップを表面プラズモン共鳴バイオセンサー (ピアコア社製、BIACORE3000) のカートリッジブロック上に設置し、1-エチル-2, 3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド (400 mM) と N-ヒドロキシスクシンイミド (100 mM) との混合液 100 μ l を流速 10 μ l/min で測定セルに流した。次に、ニュートラルアビジン溶液 (100 μ g/ml、HBS-Nバッファー (ピアコア社製、pH7.4)) 300 μ l を流速 10 μ l/min で測定セルに注入することで、ニュートラルアビジンを各サンプル表面に共有結合で固定化した。なお、HBS-Nバッファーの組成は、H E P E S (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid) 0.01mol/l (pH7.4)、NaCl 0.15mol/l である。ニュートラルアビジンの注入前と注入終了から 3 分後の共鳴シグナル (RU値) 変化量をニュートラルアビジンの固定化量 (RU値) とした。

【0074】

その後、エタノールアミン・HCl 溶液 (1M、pH8.5) 100 μ l を流速 10 μ l/min で測定セルに流すことにより、ニュートラルアビジンと反応せずに残存した COOH 基をブロックした。

【0075】

次に D-ビオチン (1 μ g/ml、HBS-Nバッファー) 100 μ l を流速 10 μ l/min で測定セルに流した。D-ビオチンの注入前と注入終了から 3 分後の共鳴シグナル (RU値) 変化量をニュートラルアビジンに対する D-ビオチンの結合量とした。

【0076】

(3) 結果

表1に蛋白質の非特異吸着の測定結果、表2に蛋白質・検体化合物間の相互作用の測定結果を示す。

【0077】

【表1】

表1

サンプル	非特異吸着量(RU値)		備考
	BSA	アビジン	
1-1	594	844	比較例
1-2	207	618	比較例
1-3	28	85	比較例
1-4	29	84	本発明
1-5	27	80	本発明

【0078】

【表2】

表2

サンプル	ニュートラルアビジン 結合量(RU値)	D-ビオチン 結合量(RU値)	備考
2-1	3020	27	比較例
2-2	2840	28	比較例
2-3	3620	40	本発明
2-4	4760	52	本発明

【0079】

表1の結果から、本発明により、極めて蛋白質の非特異吸着の少ない表面を提供できることがわかる。表2の結果から、本発明の場合でも、従来の方法より蛋白質の固定化、および検体化合物の検出が優れていることがわかる。即ち、本発明により、非特異吸着抑制能の優れた、バイオセンサー用表面を提供することができた。

【0080】

【発明の効果】

本発明により、非特異吸着を抑制したバイオセンサー用検出表面を提供することが可能になった。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 非特異吸着を抑制したバイオセンサー用検出表面を提供すること。

【解決手段】 疎水性高分子化合物でコーティングした基板から成るバイオセンサーであって、生理活性物質をバイオセンサーの表面に固定化するためのリンカーを有している上記バイオセンサー。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 5 8 7 3 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 2 0 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社